

#6

PATENT  
Customer No. 22,852  
Attorney Docket No. 03806.0510

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

Jacques DIAZ et al.

Serial No.: 09/909,797

Filed: July 20, 2001

For: COMPOSITIONS OF  
POLYSACCHARIDES DERIVED  
FROM HEPARIN, THEIR  
PREPARATION AND  
PHARMACEUTICAL  
COMPOSITIONS CONTAINING  
THEM

Commissioner for Patents and Trademarks  
Washington, DC 20231

)  
)  
) Group Art Unit: 1755  
)  
) Examiner: Unassigned  
)  
)  
)

RECEIVED  
NOV 28 2001  
TC 1700

CLAIM FOR PRIORITY

Sir:

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., Applicants hereby claim the benefit of the filing date of France Patent Application Number 0009572, filed 21 July 2000, for the above identified United States Patent Application.

In support of Applicants claim for priority, a certified copy of the priority application is filed herewith.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,  
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: November 20, 2001

By: Carol P. Einaudi  
Carol P. Einaudi  
Reg. No. 32,220

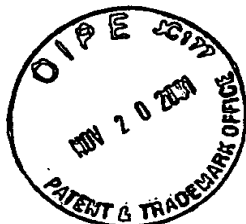
LAW OFFICES

FINNEGAN, HENDERSON,  
FARABOW, GARRETT,  
& DUNNER, L.L.P.  
1300 I STREET, N. W.  
WASHINGTON, DC 20005  
202-408-4000



10/12/2011  
10/12/2011  
10/12/2011

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

RECEIVED

NOV 23 2001

TC 1700

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

11 AVR. 2001

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30  
<http://www.inpi.fr>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>21 JUIL 2000</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0009572</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>21/07/2000</b> PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AVENTIS PHARMA S.A. Direction Brevets 20 Avenue Raymond Aron 92165 ANTONY CEDEX	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) ST 00022			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date Pays ou organisation Date Pays ou organisation Date <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PHARMA S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		3 . 0 . 4 . 4 . 6 . 3 . 2 . 8 . 4	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	20 Avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		PAYS	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)		01 55 71 71 71	
N° de télécopie (facultatif)		01 47 02 50 14	
Adresse électronique (facultatif)		www.aventis.com	

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE <b>21 JUIL 2000</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0009572</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		ST 00022	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		MORVAN	
Prénom		Michèle	
Cabinet ou Société		AVENTIS PHARMA S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG 8850	
Adresse	Rue	20 Avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92165	ANTONY CEDEX
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 55 71 72 85	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 55 71 72 91	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		Michèle.Morvan@aventis.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		<b>Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  MORVAN Michèle		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  	

DÉPARTEMENT DES BREVETS


26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		ST 00022	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		000 9572	
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>			
MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
AVENTIS PHARMA S.A. 20 Avenue Raymond Aron 92160 ANTONY			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).</b>			
<b>Nom</b>		DIAZ	
<b>Prénoms</b>		Jacques	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	24 bis rue des Parclairs	
	<b>Code postal et ville</b>	94170	LE PERREUX-SUR-MARNE
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		PECQUET	
<b>Prénoms</b>		Christelle	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	18 rue Lavoisier	
	<b>Code postal et ville</b>	93130	NOISY LE SEC
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		PERRIN	
<b>Prénoms</b>		Elisabeth	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	23 rue Poitevin	
	<b>Code postal et ville</b>	27000	EVREUX
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		ANTONY, le 21 Juillet 2000    MORVAN Michèle	
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>Aventis Pharma S.A.</b> Fondé de Pouvoir </div>	

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		ST 00022	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		000 9572	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
AVENTIS PHARMA S.A. 20 Avenue Raymond Aron 92160 ANTONY			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		VISKOV	
Prénoms		Christian	
Adresse	Rue	3 rue du Béarn	
	Code postal et ville	91130	RIS ORANGIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		ANTONY, le 21 Juillet 2000    MORVAN Michèle	
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>Aventis Pharma S.A.</b> Fondé de Pouvoir         </div>	



MELANGES DE POLYSACCHARIDES DERIVES D'HEPARINE, LEUR  
PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES  
CONTENANT

La présente invention concerne des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine,  
5 leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

L'héparine est un mélange de mucopolysaccharides sulfatés d'origine animale, utilisée  
notamment pour ses propriétés anticoagulantes et antithrombotiques.

L'héparine présente cependant des inconvénients qui limitent les conditions de son  
utilisation. En particulier, son activité anticoagulante (activité anti-IIa) importante  
10 peut occasionner des hémorragies.

Des héparines de bas poids moléculaire obtenues par dépolymérisation basique  
d'esters d'héparine ont été proposées (EP40144); cependant ces produits ont encore  
une activité anti-IIa importante.

L'invention est relative à des mélanges de polysaccharides dérivés d'héparine  
15 possédant une activité plus sélective vis-à-vis du facteur X activé (facteur Xa) et du  
facteur II activé (facteur IIa) que l'héparine.

La présente invention a plus particulièrement pour objet les mélanges de  
polysaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides  
constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :

20 - ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de  
100 à 150 UI/mg, une activité anti-IIa de 0 à 10 UI/mg et un rapport activité anti-  
Xa/activité anti-IIa supérieur à 10,

- les polysaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs  
saccharidiques et ont un motif acide glucuronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de  
25 leurs extrémités,

sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.

Comme sel de métal alcalin ou alcalinoterreux, sont préférés les sels de sodium,  
potassium, calcium et magnésium.

Le poids moléculaire moyen est déterminé par chromatographie liquide haute pression en utilisant deux colonnes en série par exemple celles commercialisées sous le nom de TSK G3000 XL et TSK G2000 XL. La détection est réalisée par réfractométrie. L'éluant utilisé est du nitrate de lithium et le débit est de 0,6 ml/min. Le système est  
 5 calibré avec des standards préparés par fractionnement de l'énoxaparine (AVENTIS) par chromatographie sur gel d'agarose-polyacrylamide (IBF). Cette préparation est réalisée selon la technique décrite par Barrowcliffe et coll., *Thromb. Res.*, 12, 27-36 (1977-78) ou D.A. Lane et coll., *Thromb. Res.*, 12, 257-271 (1977-78). Les résultats sont calculés à l'aide du logiciel GPC6 (Perkin Elmer).

10 L'activité anti-Xa est mesurée par la méthode amidolytique sur un substrat chromogénique décrite par Teien et coll., *Thromb. Res.*, 10, 399-410 (1977), avec comme étalon le premier étalon international des héparines de bas poids moléculaire.

L'activité anti-IIa est mesurée par la technique décrite par Anderson L.O. et coll., *Thromb. Res.*, 15, 531-541 (1979), avec comme étalon le premier étalon international  
 15 des héparines de bas poids moléculaire.

De préférence, les mélanges selon l'invention ont une activité anti-IIa de 0 à 5 UI/mg.

Encore plus préférentiellement, les mélanges présentent un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 25.

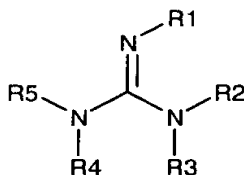
Les mélanges d'oligosaccharides selon l'invention peuvent être préparés par  
 20 dépolymérisation d'un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pKa supérieur à 20 ou d'imidazolate de sodium, transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponification de l'ester et éventuellement purification.

25 Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est de préférence le sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthylammonium.

La dépolymérisation s'effectue généralement au sein d'un solvant organique inerte tel qu'un solvant chloré (dichlorométhane par exemple), le tétrahydrofurane, l'anisole, à une température de -20°C à 40°C.

Comme base organique forte de pka supérieur à 20, on peut utiliser le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène, la 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine, les bases de la famille de la guanidine et des phosphazènes.

- 5 Les bases de la famille des guanidines sont de préférence celles de formule :

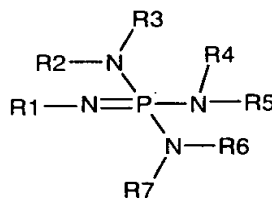


dans laquelle R<sub>1</sub> est hydrogène ou alkyle, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> identiques ou différents représentent chacun un radical alkyle.

Plus particulièrement, R<sub>1</sub> est hydrogène et R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont des radicaux méthyle.

- 10 Les bases organiques fortes apparentées à la famille des phosphazènes sont définies par exemple selon R. Schwesinger et coll., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 1167-1169 (1987), R. Schwesinger et coll., Angew. Chem. 105, 1420 (1993).

Parmi les bases de la famille des phosphazènes on utilise, de préférence, celles de formule :



15

dans laquelle les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>7</sub> sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle.

Dans les formules précédentes, les radicaux alkyle contiennent 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

- 20 Avantageusement, le rapport en mole base organique forte de pka supérieur à 20 ou imidazolate de sodium/sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 0,2 et 5 et, de préférence, entre 1 et 4.

Plus particulièrement, le taux d'estérification du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 50 et 100% et, de préférence, entre 70 et 90%. Ce taux d'estérification correspond au pourcentage molaire d'estérification des acides uroniques de l'héparine.

- 5 La transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium est effectuée, généralement, par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium et, de préférence, avec une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol (poids/volume), à une température comprise entre 15 et 25°C. L'équivalent en poids d'acétate ajouté est  
10 préférentiellement 3 fois supérieur à la masse de sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine engagé dans la réaction de dépolymérisation.

- La saponification s'effectue généralement au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin tel que la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 0 et 20°C et, de préférence, entre 0 et 10°C. On utilisera de  
15 façon générale de 1 à 5 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin. De préférence, la saponification sera réalisée en présence de 2 à 3 équivalents molaires d'hydroxyde de métal alcalin.

- Le produit final peut éventuellement être purifié par toute méthode connue de purification des héparines dépolymérisées et notamment selon la méthode décrite  
20 dans le brevet EP 0037319. De préférence, on purifie au moyen de peroxyde d'hydrogène, en milieu aqueux, à une température de 10 à 50°C. De préférence, cette opération sera réalisée entre 20 et 40°C.

Le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon le schéma réactionnel suivant :

- 25 a) transformation de l'héparine sous forme de sel de sodium au moyen du chlorure de benzéthonium pour obtenir l'héparinate de benzéthonium,  
b) estérification du sel de benzéthonium obtenu précédemment au moyen du chlorure de benzyle et traitement par une solution alcoolique d'acétate de sodium pour obtenir le sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine,

c) transalification du sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine en sel d'ammonium quaternaire et, de préférence en sel de benzéthonium, de cétypyridinium ou de cétyltriméthylammonium,

5 La réaction de l'étape a) est réalisée en milieu aqueux, par action du chlorure de benzéthonium en excès, sur l'héparine sous forme de sel de sodium, à une température voisine de 15 à 25°C. De manière avantageuse, le rapport molaire chlorure de benzéthonium/héparine sous forme de sel de sodium est compris entre 2 et 3 et plus particulièrement 2,5.

10 L'héparine sous forme de sel de sodium de départ utilisée est de préférence une héparine de porc. Celle-ci peut être préalablement purifiée pour diminuer son taux de dermatane sulfate selon le procédé décrit dans le brevet FR2663639.

15 L'estérification de l'étape b) s'effectue de préférence au sein d'un solvant organique chloré (chloroforme, chlorure de méthylène par exemple), à une température comprise entre 25 et 45°C et, de préférence entre 30 et 40°C. L'ester sous forme de sel de sodium est ensuite récupéré par précipitation au moyen d'acétate de sodium à 10% en poids/volume dans un alcool tel que le méthanol. On emploie généralement 1 à 1,2 volume d'alcool par volume de milieu réactionnel. La quantité de chlorure de benzyle et le temps de réaction sont adaptés pour obtenir un taux d'estérification compris entre 50 et 100% et, de préférence, entre 70 et 90%. De façon préférentielle, on utilise 0,5  
20 à 1,5 partie en poids du chlorure de benzyle pour 1 partie en poids du sel de benzéthonium de l'héparine. De même, de façon préférentielle, le temps de réaction sera compris entre 10 et 35 heures.

25 La transalification de l'étape c) s'effectue au moyen d'un chlorure d'ammonium quaternaire et, de préférence, au moyen de chlorure de benzéthonium, de chlorure de cétypyridinium ou de chlorure de cétyltriméthylammonium, en milieu aqueux, à une température comprise entre 10 et 25°C. De manière avantageuse, le rapport en mole chlorure d'ammonium quaternaire/sel de sodium de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 2 et 3.

30 Les mélanges selon l'invention sous forme de sel de sodium, peuvent être transformés en un autre sel d'un métal alcalin ou alcalinoterreux. On passe éventuellement d'un sel à l'autre en utilisant la méthode décrite dans le brevet US4168377.

Les mélanges selon l'invention ne sont pas toxiques et peuvent ainsi être utilisés comme médicaments.

Les mélanges de la présente invention peuvent être utilisés comme agents antithrombotiques. En particulier, ils sont utiles pour la prévention des thromboses veineuses, des accidents thrombotiques artériels, notamment dans le cas d'infarctus du myocarde. Ils sont également utiles dans la prévention et le traitement de la prolifération des cellules musculaires lisses, l'angiogénèse, et comme agent neuroprotecteurs de l'athérosclérose et de l'artériosclérose.

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif un mélange de polysaccharides selon l'invention éventuellement en association avec un ou plusieurs excipients inertes.

Les compositions pharmaceutiques sont par exemple des solutions injectables par voie sous-cutanée ou intraveineuse. Elles sont également utiles par voie pulmonaire (inhalation).

La posologie peut varier en fonction de l'âge, du poids et de l'état de santé du patient. Pour un adulte, elle est en général comprise entre 20 et 100 mg par jour par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

#### EXEMPLE A : PREPARATION DU SEL DE BENZETHONIUM DE L'ESTER BENZYLIQUE DE L'HEPARINE

##### Heparinate de benzéthonium

A une solution de 10 g d'héparine sous forme de sel de sodium dans 100 ml d'eau à une température voisine de 20°C, on ajoute une solution de 25 g de chlorure de benzéthonium dans 125 ml d'eau. Le produit est filtré, lavé à l'eau et séché.

##### Ester benzylique d'héparine (sel de sodium)

A une solution de 20 g d'héparinate de benzéthonium dans 80 ml de chlorure de méthylène, on ajoute 16 ml de chlorure de benzyle. La solution est chauffée à une température de 30°C pendant 12 heures. On ajoute alors 108 ml d'une solution à 10% d'acétate de sodium dans le méthanol, filtre, lave au méthanol et sèche. On obtient

ainsi 7,6 g d'ester benzylique d'héparine sous forme de sel de sodium dont le taux d'estérification est de 77%.

#### Ester benzylique d'héparine (sel de benzéthonium)

Dans un erlenmeyer A de 2 litres, on introduit 36 g (0,0549 mole) d'ester benzylique d'héparine (sel de sodium) et 540 ml d'eau distillée. Après homogénéisation à une température d'environ 20°C, on obtient une solution jaune pâle. Sous agitation magnétique, on prépare dans un erlenmeyer B de 1 litre, une solution de 64,45 g (0,1438 mole) de chlorure de benzéthonium et de 450 ml d'eau. La solution de l'erlenmeyer B est coulée en environ 35 minutes dans la solution de l'erlenmeyer A sous agitation. On observe la formation d'un précipité blanc abondant. L'erlenmeyer B est rincé avec 200 ml d'eau distillée et l'eau de lavage est introduite dans l'erlenmeyer A. L'agitation est alors arrêtée et on laisse déposer la suspension pendant 12 heures. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée. Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 560 ml d'eau et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité en 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (560 ml). Sur le précipité sédimenté, on renouvelle deux fois cette opération de lavage par environ 560 ml d'eau distillée. Dans la dernière opération de lavage, on laisse le précipité en suspension et on filtre sur Verre Fritté 3. Le gâteau est ensuite lavé par 4 fois 200 ml d'eau distillée. Le solide blanc humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 87,5 g d'ester benzylique d'héparine, sel de benzéthonium. Le rendement obtenu est de 94,9%.

#### EXEMPLE 1

##### Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,32 g (0,00948 mole) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène. On agite à une température voisine de 20°C, pendant 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution

méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (62 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (49 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau jaune d'or obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,21 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,2%.

#### Saponification :

Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 1,21 g (0,0018 mole) de l'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) obtenue précédemment et 11 ml d'eau. Sous agitation magnétique, on introduit 0,18 ml (0,0018 mole) de lessive de soude à 30%. Après addition, le mélange est refroidi à 4°C et agité pendant 2 heures. On ajoute 1,43 g de NaCl et on neutralise la solution par ajout d'HCl à 1mole/l (14 ml). Le mélange est transvasé dans un erlenmeyer de 100 ml et 52 ml de méthanol sont ajoutés. On observe la formation d'un précipité jaune. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (44 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (21 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 25 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau jaune clair obtenu est ensuite lavé par 2 fois 10 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,66 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 60%.

#### Purification :

Dans un erlenmeyer de 10 ml, on introduit 0,66 g d'héparine dépolymérisée brute obtenue précédemment et 5,9 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à 40°C sous agitation magnétique. Par addition de soude à 0,1 mole/l, on porte le pH entre 9 et 10



- et on ajoute 33 microlitres d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après environ 2 heures d'agitation, on ajoute 0,65 g de chlorure de sodium. Le mélange est ensuite neutralisé par ajout d'HCl à 0,1 mole/l. La solution est ensuite filtrée et transvasée dans un erlenmeyer de 25 ml. On coule 23,3 ml de méthanol. On observe la formation d'un précipité blanc. L'agitation est alors arrêtée et on laisse sédimenter la suspension pendant 12 heures à une température voisine de 20°C. Le surnageant est ensuite prélevé puis écarté (5 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie), on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (5 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 5 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau blanc obtenu est ensuite lavé par 2 fois 5 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 0,51 g d'un mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,2%.

Les caractéristiques de ce mélange sont les suivantes :

Poids moléculaire moyen : 1600 daltons

Activité anti-Xa : 94 UI/mg

Activité anti-IIa : < 0,1 UI/mg

- Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : > 100

## EXEMPLE 2

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- Dans un erlenmeyer A de 100 ml, on introduit 70 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 10 g (0,00595 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète, on ajoute 1,7 ml (0,00587 mole) de 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthyl-perhydro-1,3,2-diazaphosphorine. A une température voisine de 20°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 30 g d'acétate de sodium dans 300 ml de méthanol. Sous agitation

- magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (204 ml). Sur le
- 5 précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 125 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimenter le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (162 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 125 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité gélatineux en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 3. Le gâteau gélatineux jaune obtenu est ensuite lavé par
- 10 2 portions de 63 ml de méthanol. Le solide gélatineux est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 3,34 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 85,3%.

Saponification :

- 15 On saponifie 1,67 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,94 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 61%.

Purification :

- 20 On purifie 0,94 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon le procédé de purification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,71 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 75,5%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 25 Poids moléculaire moyen : 2500 Daltons

Activité anti-Xa : 146,6 UI/mg

Activité anti-IIa : 2,15 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 68

## EXEMPLE 3

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique d'héparine (taux  
 5 d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu selon l'exemple A. Après dissolution complète et refroidissement à 2°C, on ajoute 0,333 g (0,00239 mole) de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène. A une température voisine de 20°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans  
 10 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant est prélevée et écartée (90 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaune), on ajoute 50 ml de  
 15 méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (61 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide humide est essoré puis séché sous pression  
 20 réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,19 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le solide est jaune intense. Le rendement obtenu est de 75,9%.

Saponification :

On saponifie 1,19 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium)  
 25 précédemment obtenue selon le procédé de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,78 g d'une poudre jaune clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 71,5%.

Purification :

On purifie 0,78 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment  
 30 obtenue selon la méthode de purification décrite dans l'exemple 1. On obtient 0,58 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 72,5%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2700 Daltons

Activité anti-Xa : 100,1 UI/mg

5    Activité anti-IIa : 3,3 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 27,3

#### EXEMPLE 4

Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

10    Dans un erlenmeyer A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'ester benzylique de l'héparine (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium) obtenu comme décrit dans l'exemple A. Après dissolution complète et à 2°C, on ajoute 0,6 ml (0,00222 mole) de 2-tert-butylimino-tris(diméthylamino)phosphorane. A une température voisine de 0°C, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 3 heures et 30 minutes.

15    Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du

20    surnageant est prélevée et écartée (108 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie jaunâtre), on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (60 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité blanc jaunâtre en suspension est ensuite filtré sur

25    Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,22 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 77,8 %.

### Saponification :

- On saponifie 1,22 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,69 g d'une poudre jaune très clair. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 61,6%.

### Purification :

- On purifie 0,69 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de purification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,67 g d'une poudre blanche. Le rendement est de 97,1%.
- 10 Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

Poids moléculaire moyen : 2900 Daltons

Activité anti-Xa : 145,2 UI/mg

Activité anti-IIa : 4,5 UI/mg

- 15 Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 32,6

### EXEMPLE 5

#### Dépolymérisation et transformation en sel de sodium :

- Dans un ballon A de 50 ml, on introduit 28 ml de dichlorométhane. Sous agitation, on charge lentement 4 g (0,00238 mole) d'héparinate de benzyle (taux d'estérification : 77%, sel de benzéthonium). Après dissolution complète et à 40°C, on ajoute 0,95 g (0,00949 mole) d'imidazolate de sodium. Au reflux du dichlorométhane, on laisse la réaction se poursuivre pendant environ 4 heures. Pendant ce temps, on prépare à 4°C dans un erlenmeyer B, une solution de 12 g d'acétate de sodium dans 120 ml de méthanol. Sous agitation magnétique, le mélange réactionnel de l'erlenmeyer A est coulé dans la solution méthanolique d'acétate de sodium. Un précipité jaune gélatineux quasi-translucide apparaît. L'agitation est alors arrêtée et on laisse décanter la suspension pendant une heure. La partie limpide du surnageant orange est prélevée et écartée (88 ml). Sur le précipité sédimenté (aspect de bouillie orange), on ajoute

- 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. On laisse re-sédimer le précipité 30 minutes environ. Le surnageant est prélevé et écarté (51 ml). Sur le précipité sédimenté, on ajoute 50 ml de méthanol et on agite pendant 20 minutes. Le précipité orange en suspension est ensuite filtré sur Verre Fritté 4. Le gâteau obtenu
- 5 est ensuite lavé par 2 fois 25 ml de méthanol. Le solide est essoré puis séché sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 60°C. Après 12 heures de séchage, on obtient 1,34 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium). Le rendement obtenu est de 76,6%.

Saponification :

- 10 On saponifie 1,2 g d'héparine dépolymérisée (ester de benzyle, sel de sodium) précédemment obtenue selon le protocole de saponification décrit dans l'exemple 1. On obtient 0,63 g d'une poudre beige. Le rendement en héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) est de 52,5%.

Purification :

- 15 On purifie 0,63 g d'héparine dépolymérisée brute (sel de sodium) précédemment obtenue selon la méthode de purification décrite dans l'exemple 1. On obtient 0,42 g d'une poudre blanc beige. Le rendement est de 66,7%.

Le mélange purifié de polysaccharides (sel de sodium) obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- 20 Poids moléculaire moyen : 2250 Daltons

Activité anti-Xa : 134,5 UI/mg

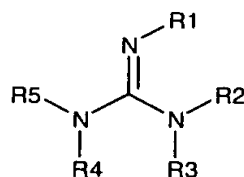
Activité anti-IIa : 1,5 UI/mg

Rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa : 90,5

## REVENDICATIONS

- 1 - Mélanges de polysaccharides sulfatés possédant la structure générale des polysaccharides constitutifs de l'héparine et présentant les caractéristiques suivantes :
- ils ont un poids moléculaire moyen de 1500 à 3000 daltons, une activité anti-Xa de 100 à 150 UI/mg, une activité anti-IIa de 0 à 10 UI/mg et un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 10,
  - les polysaccharides constitutifs des mélanges contiennent 2 à 26 motifs saccharidiques et ont un motif acide glucuronique-4,5 insaturé 2-O-sulfate à l'une de leurs extrémités,
- 10 sous forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux.
- 2 - Mélanges selon la revendication 1 sous forme de sel de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium.
- 3 - Mélanges selon l'une des revendications 1 ou 2 ayant une activité anti-IIa de 0 à 5 UI/mg.
- 15 4 - Mélanges selon l'une des revendications 1 à 3 présentant un rapport activité anti-Xa/activité anti-IIa supérieur à 25.
- 5 - Procédé de préparation des mélanges de la revendication 1 caractérisé en ce que l'on dépolymérise un sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine en milieu organique, au moyen d'une base organique forte de pka supérieur à 20 ou d'imidazolate de sodium, transforme le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium, saponifie l'ester et éventuellement purifie le produit.
- 20 6 - Procédé selon la revendication 5 pour lequel le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est le sel de benzéthonium, de cétylpyridinium ou de cetyltriméthylammonium.
- 25 7 - Procédé selon la revendication 5 pour lequel la base organique forte de pka supérieur à 20 est choisie parmi le 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène, la 2-tert-butylimino-2-diéthylamino-1,3-diméthylperhydro-1,3,2-diazaphosphorine, les bases de la famille de la guanidine et des phosphazènes,

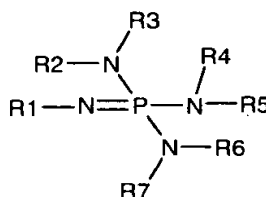
8 - Procédé selon la revendication 7 pour lequel les bases de la famille des guanidines sont celles de formule :



5 dans laquelle R<sub>1</sub> est hydrogène ou alkyle, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> identiques ou différents représentent chacun un radical alkyle, les radicaux alkyle ayant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

9 - Procédé selon la revendication 8 pour lequel R<sub>1</sub> est hydrogène et R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub> sont des radicaux méthyle.

10 10 - Procédé selon la revendication 7 pour lequel les bases de la famille des phosphazènes sont celles de formule :



dans laquelle les radicaux R<sub>1</sub> à R<sub>7</sub> sont identiques ou différents et représentent des radicaux alkyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, en chaîne droite ou ramifiée.

15 11 - Procédé selon l'une des revendications 5 à 10 pour lequel le rapport en mole base organique forte de pka supérieur à 20 ou imidazolate de sodium/sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine est compris entre 0,2 et 5.

12 - Procédé selon l'une des revendications 5 à 11 pour lequel le sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine a un taux d'estérification compris entre 50 et 100%.

20 13 - Procédé selon l'une des revendications 5 à 12 pour lequel la transformation du sel d'ammonium quaternaire de l'ester benzylique de l'héparine dépolymérisée en sel de sodium est effectuée par traitement du milieu réactionnel avec une solution alcoolique d'acétate de sodium.



14 - Procédé selon l'une des revendications 5 à 13 pour lequel la saponification s'effectue au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin.

15 - Procédé selon l'une des revendication 5 à 14 pour lequel la purification s'effectue au moyen de peroxyde d'hydrogène.

- 5 16 - Compositions pharmaceutiques comprenant en tant que principe actif un mélange selon l'une des revendications 1 à 4.

ORIGINAL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**